



Study of body fluid samples using flow cytometry: Six years of experience at the Hospital Universitario San Ignacio - Pontificia Universidad Javeriana, Bogota - Colombia

Alba Campos¹, Laura Trujillo², Derly López², Lina Beltrán², Eliana Arias¹, Graciela Vélez¹,
Antonia Infante¹, Iliana De Los Reyes^{3,7}, Martha Vizcaíno^{3,7}, Paula Carolina Guzmán^{3,7},
Maria Victoria Herrera³, Julio Solano³, Dario Londoño⁴, Alejandra Cañas⁴, Felipe Pretelt⁵,
Juan Carlos Pérez⁶, Claudia Cardozo¹, Susana Fiorentino⁸. Sandra Oujiano^{1,8,*}

Univ. Sci. 22 (2): 123-143, 2017.

**VII Curso de Actualización en Oncopatología y III Curso-Taller de
Citometría de Flujo
Concepción-Chile 2019**
squijano@javeriana.edu.co

INTRODUCCIÓN

- En la última década en Colombia la CMF ha evolucionado de forma importante y se utiliza actualmente para el **diagnóstico, clasificación y seguimiento** de diversas patologías hematológicas y no hematológicas.
- Ventajas de la CMF: Se puede realizar en **diferentes tipos de muestras biológicas** que incluyen M.O, SP, aféresis, cordón umbilical, biopsias de tejido y **líquidos corporales**.

Desde 2008

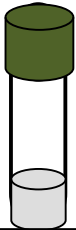
El Servicio de Citometría de la Facultad de Ciencias de la **PUJ** empezó a **implementar** la CMF en el estudio de muestras especiales mejorando las condiciones de calidad

El servicio se traslada a **HUSI** y en la actualidad en la rutina clínica se evalúan muestras de **líquidos corporales** de pacientes pediátricos y adultos con diversas enfermedades que requieren una correcta clasificación y estadiaje.

Limitaciones de la CMF en la detección de enfermedad leptomeníngea en LCR

- Bajo número de células
- Baja concentración celular
- Escasa viabilidad celular
- Escaso volumen de muestra
- Contaminación con SP

Recomendaciones técnicas para el estudio de muestras de LCR por CMF



Volumen de muestra

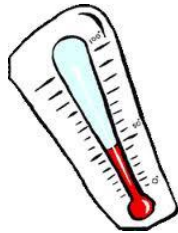
Ideal: 2-5 mL

Algunos reportes: 10-15 mL



Muestras no estabilizadas

Inmediato/antes de la primera hora/
máximo 3 horas

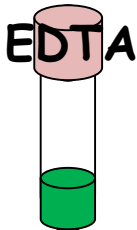


Muestras + medio de cultivo + **BSA 0.5%**
ó medio + **SFB 10%**
Preserva células entre
5-24 horas

Mantener 4°C



LCR + RPMI +
SFB 10%
Mantener a temperatura
ambiente (21-23°C)
Procesadas máximo
2 horas post-obtención



Muestras
Estabilizadas con
Transfix
dilución final 1/10
Hasta 48-72 horas
SP: recuento de linfocitos
Estabilidad > 10 días

Subira D. Am J Clin Pathol 2002
Enting RH. Cancer Treat Res. 2005
Petzold A. Neurocit Care. 2006
Kraan J. Curr Protoc Cytom 2008
Quijano S. J Clin Oncol. 2009
de Graaf MT. Cytometry B Clin Cytom 2011
Langerak AW. Leukemia 2012
Tembhare P. Am J Clin Pathol 2012

Fase pre-analítica de los estudios por CFM



Calidad de la muestra

Tabla 2. Manejo de muestras para estudios inmunofenotípicos mediante citometría multiparamétrica.

Tipo de muestra	Tiempo**	Lavados	Estabilizantes	Centrifugación	Anticoagulantes	SS/PBS transporte*
Sangre periférica** *	Hasta 24 horas	Sí	No	Sí	EDTA, heparina	No
Médula ósea	Hasta 24 horas	Sí	No	Sí	EDTA, heparina	No
Sangre de cordón umbilical	Hasta 24 horas	No	No	No	EDTA, heparina	No
Productos de leucoféresis	Hasta 24 horas	No	No	No	EDTA, heparina	No
Biopsias de tejidos sólidos***	60 minutos	Sí	No	Sí	No	Sí
Punciones de tejidos sólidos (PAAF)***	60 minutos	Sí	No	Sí	No	Sí
Líquido ceforraquídeo (LCR)	30 minutos (sin estabilizar)	Sí	Sí****	Sí (máximo dos pasos)	EDTA	No
Otros fluidos corporales***	60 minutos	Sí	Sí	Sí	EDTA	Sí

* SS (solución salina) o PBS (phosphate buffered saline) para transporte.

** Tiempo máximo comprendido entre la obtención, transporte y procesamiento de la muestra. En el caso de muestras de líquido ceforraquídeo, si no es posible procesarlas en un tiempo inferior a 30 minutos, se recomienda el uso de estabilizantes.

*** Las muestras pueden ser estabilizadas si se requiere confirmar estudios posteriores que no pueden ser practicados durante el tiempo máximo de procesamiento.

**** Estudios recientes (22,39) demuestran que el empleo de una solución estabilizante previene la pérdida celular debida a los efectos citotóxicos in vitro del líquido ceforraquídeo sobre los leucocitos, manteniéndose la eficacia de la estabilización por periodos superiores a las 24-48 horas de su obtención.

ESTUDIO DE MENINGITIS NEOPLASICA: CMF versus CITOLOGIA

Table 1. Comparison of FC and CC for the Detection of Malignant Lymphocytes in the CSF of Patients With Hematological Malignancies

Study	No.	Sensitivity	
		Positive FC No.	Positive CC No.
Hegde 2005 ¹⁹	51	11 (22%)	1 (2%)
Di Noto 2008 ²⁶	42	11 (26%)	4 (9.5%)
Quijano 2009 ²⁰	123	27 (22%)	7 (6%); suspicious in 3 (2%)
Bromberg 2007 ²⁷	219	44 (73%) ^a	19 (32%)
Schinstine 2006 ²⁸	32	19 (59%)	Repeat cytology: 9 (47% of 19)

La mayoría de estudios incluyen pacientes de **nuevo diagnóstico**

Patient Population (Inclusion Criteria)

High risk of CNS disease:

- DLBCL with either ≥ 2 extranodal sites and \uparrow LDH or bone marrow involvement

- BL

- AIDS-related lymphoma

High risk of CNS disease:

- DLBCL, BV-MCL, B-LBL, or T-LBL with either ≥ 2 extranodal sites and \uparrow LDH or bone marrow involvement

- BL

High risk of CNS disease:

- Aggressive B-NHL with either infiltration of extranodal sites (testis, breast, paranasal sinus, and/or bone marrow), neurological symptoms, or \uparrow LDH

Patients who underwent CSF evaluation for hematological malignancy

Patients with an initial CSF diagnosis of "atypical" or "suspicious"

Abbreviations: AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; BL, Burkitt lymphoma; B-LBL, B-cell precursor lymphoblastic lymphoma; B-NHL, B-cell non-Hodgkin lymphoma; BV-MCL, blastoid variant of mantle cell lymphoma; CC, conventional cytology; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; FC, flow cytometry; LDH, lactate dehydrogenase; T-LBL, T-cell lymphoblastic lymphoma.

^aSixty of the original 219 patients had positive FC and/or CSF cytology.

Diversos trabajos demuestran la alta sensibilidad de la CMF para la detección de infiltración tumoral en muestras especiales.

El manejo de muestras de líquidos corporales requiere de unas condiciones especiales de almacenamiento, transporte, preparación y marcaje.

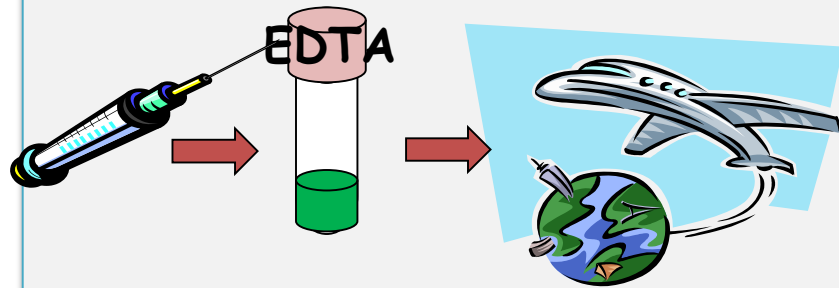
Objetivo

Describir los hallazgos del estudio por CMF de muestras especiales estabilizadas con Transfix en un periodo de 6 años en el servicio de citometría de la Pontificia Universidad Javeriana y el Hospital Universitario San Ignacio.

1. Protocolo para el marcaje por CMF

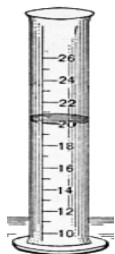
a. Fase pre-analítica

Muestras de líquidos corporales estabilizadas
(Transfix, Cytomark)



Previene pérdida celular por
periodos superiores a 24-48 horas
(MO y SP)
LCR: mantiene celularidad >10d a
2-8°C

b. Fase analítica



Medir y
registrar
volumen
recibido



Centrifugar



Retirar
sobrenadante con
pipeta Pasteur o
micropipeta



Resuspender Pellet
con 300 μ l PBS +
albúmina 0.5%



b. Fase analítica: Marcaje de la muestra



PANELES DE MARCAJE

LINFOMA NO HODGKIN, Pacientes VIH+

Lambda (λ)	Kappa (κ)	CD19	CD3	CD14	CD45	Esferas
------------	-----------	------	-----	------	------	---------

MIELOMA MULTIPLE

cy λ	cy κ	CD19	CD38	CD138	CD45	Esferas
CD3	CD 56	CD19	CD38	CD138	CD45	Esferas

LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA - B

CD34	CD10	CD19	CD3	CD14	CD45	Esferas
------	------	------	-----	------	------	---------

LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA - T

CD7	CD5	CD34	CD3	CD14	CD45	Esferas
-----	-----	------	-----	------	------	---------

LINFOMA DE HODGKIN

CD30	CD200	CD3	CD38	CD14	CD45	Esferas
------	-------	-----	------	------	------	---------

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

CD34	CD117	CD19	CD3	CD14	CD45	Esferas
------	-------	------	-----	------	------	---------

b. Fase analítica: Procesamiento de la muestra



Centrifugar 10 min
a 2000 rpm

Descartar el sobrenadante con
pipeta pasteur o micropipeta



Adicionar 0.3 ml de PBS +
esferas fluorescentes

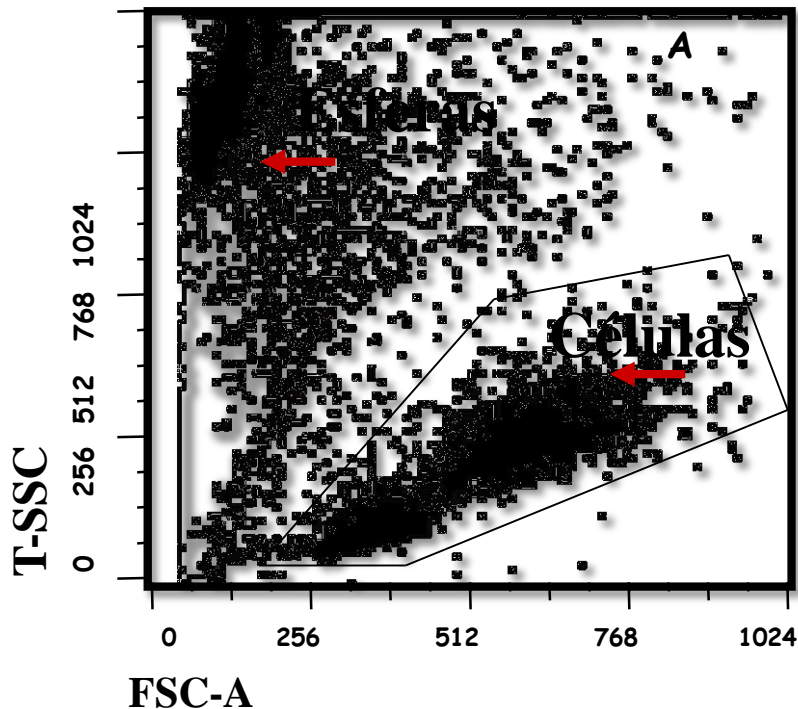


Mezclar y adquirir la totalidad
de la muestra en Citómetro de
flujo FACS CANTO II BD



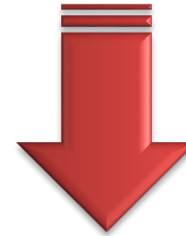
CÁLCULO DE POBLACIONES CELULARES

Valores relativos y absolutos de poblaciones celulares



Muestra de LCR.

Calcular el número absoluto
total de células en
muestra/ μ l

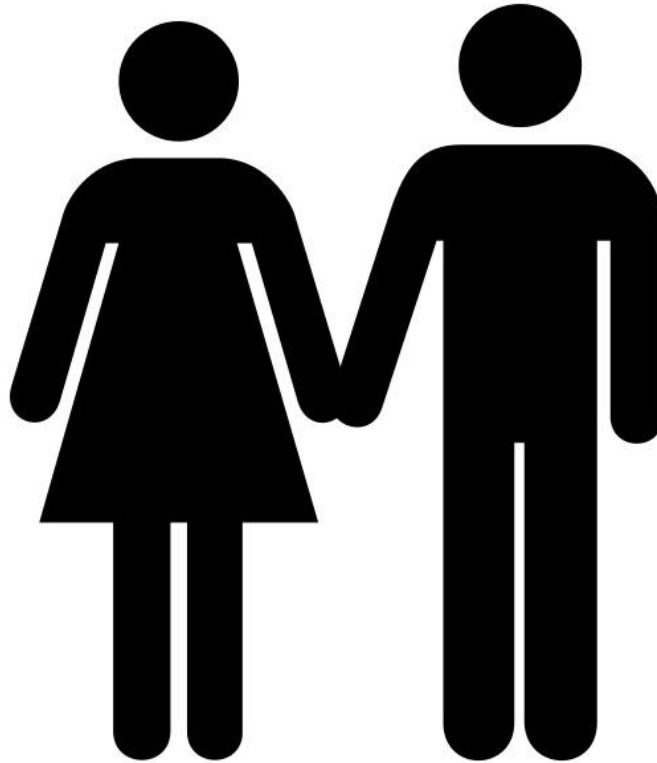


$$\left[\frac{\#célulasengate}{\#microesferasengate} \times \frac{\#microesferasañadidasportubo(a)}{volumendemuestra(uL)(b)} \times factordeconversión(c) = células / uL \right]$$

1. Número de muestras especiales analizadas en el periodo comprendido entre Junio 2008-Junio 2014

n= 1070 casos

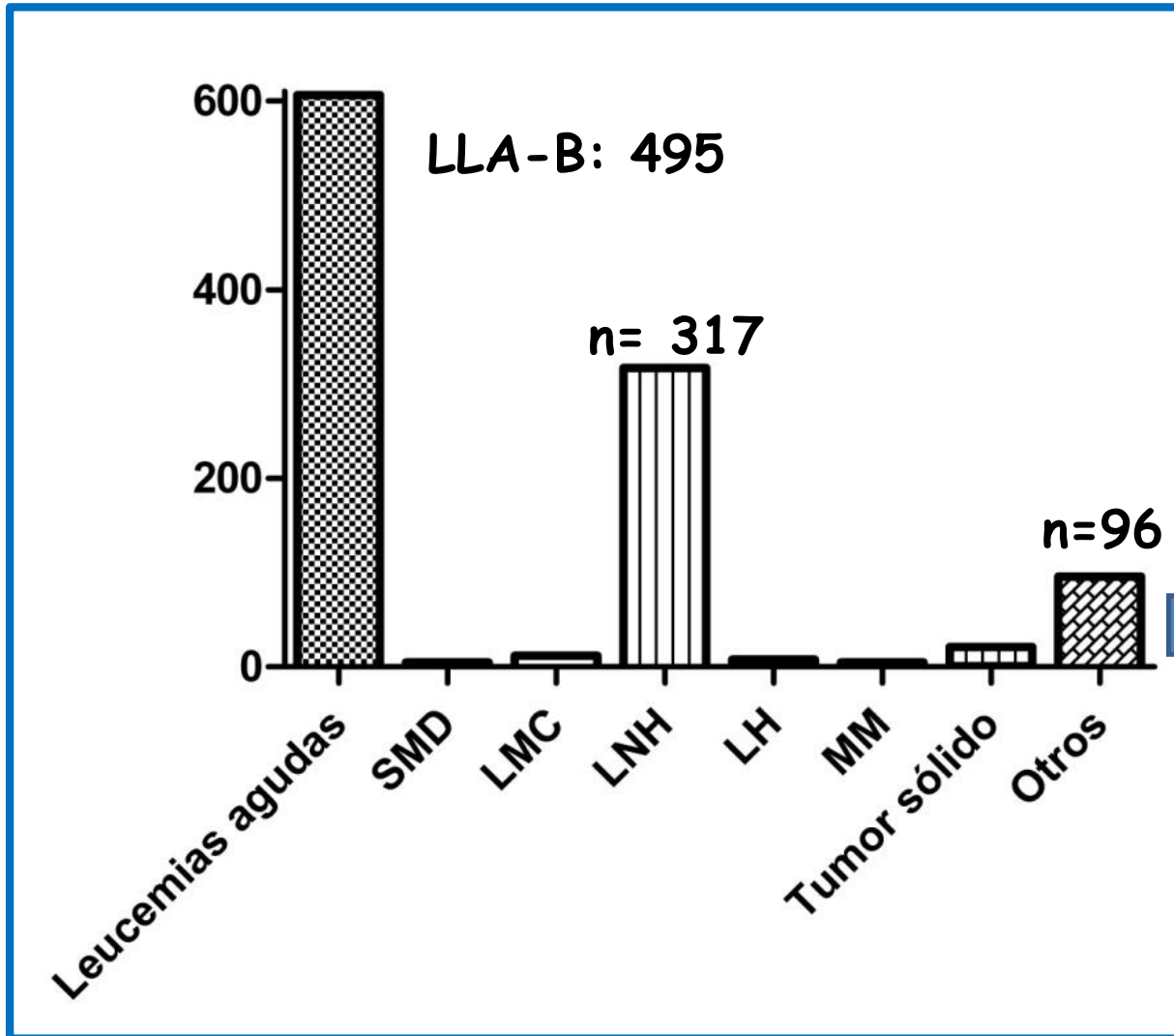
417 (39%)



653 (61%)

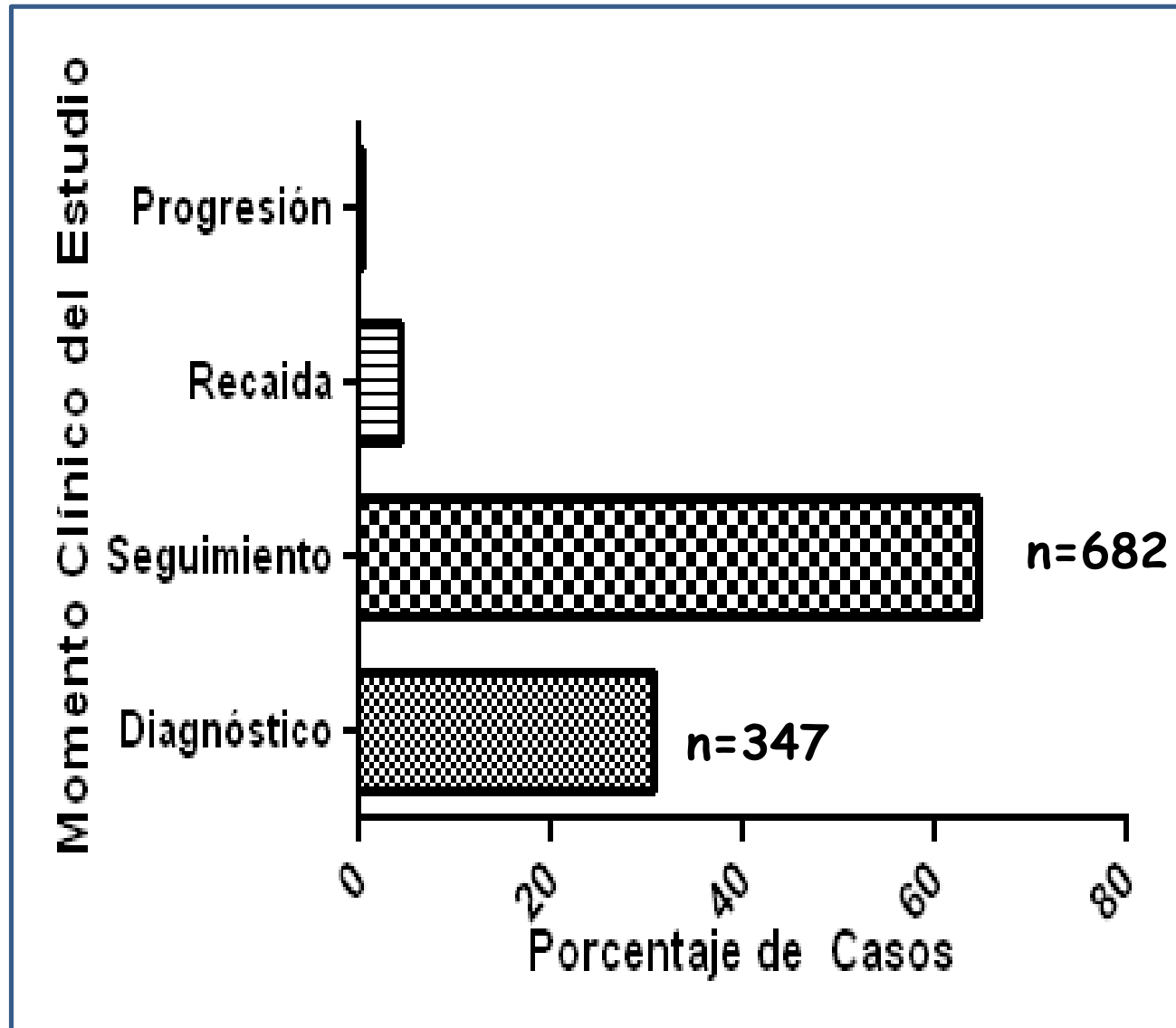
Edad promedio: 37 años; Rango: 3 meses-86 años

2. La mayoría de casos corresponden a leucemias agudas

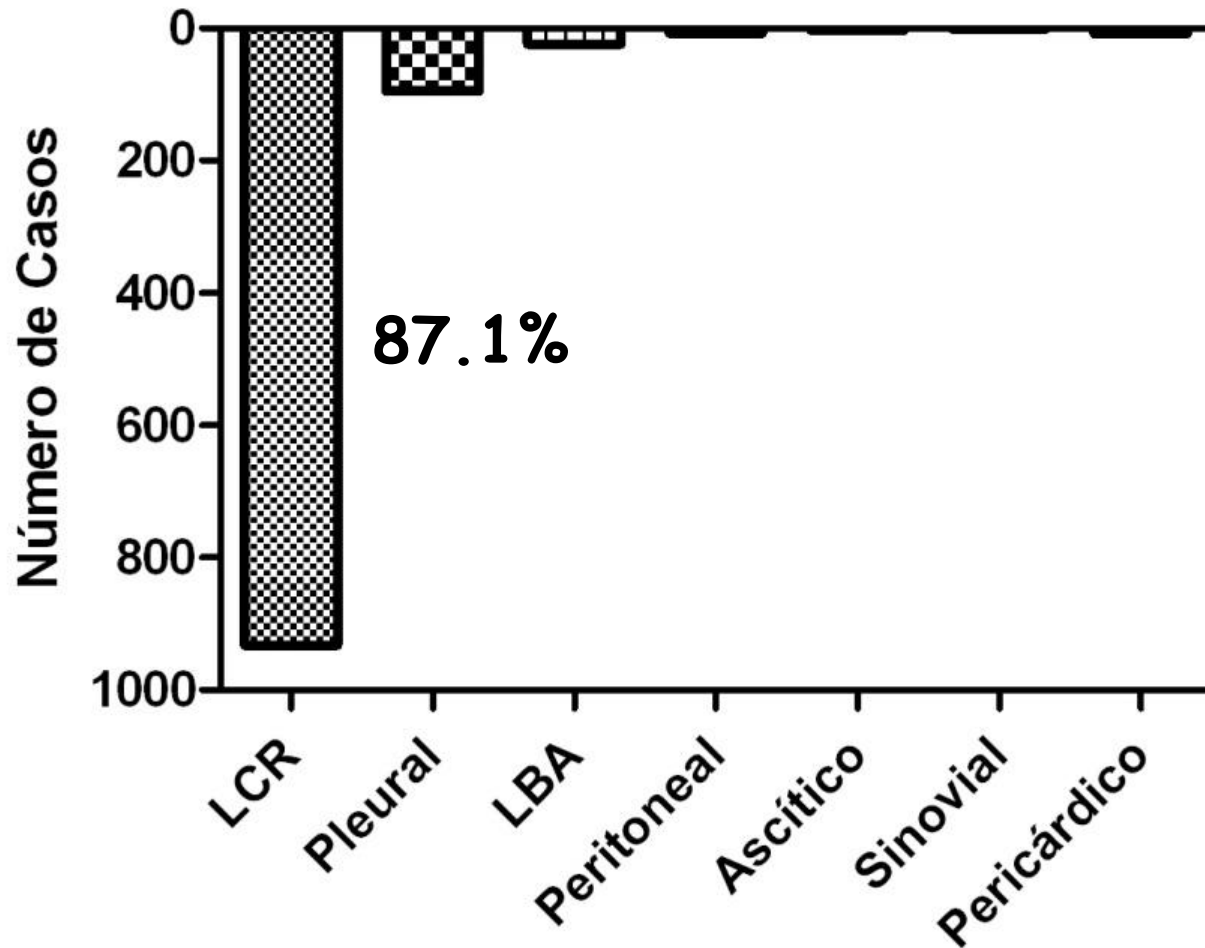


Pacientes VIH+,
enfermedades
autoinmunes,
procesos
infecciosos,
cefalea, etc.

3. El 64% de las muestras especiales analizadas, se evalúan en el seguimiento clínico de la enfermedad



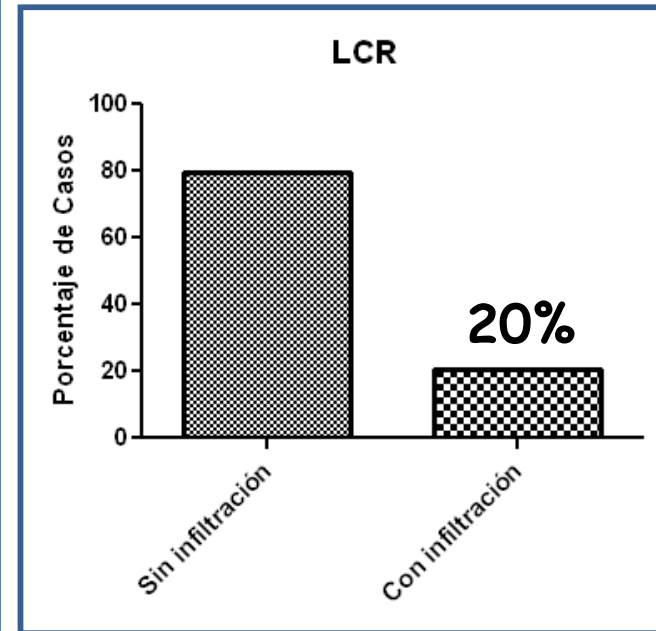
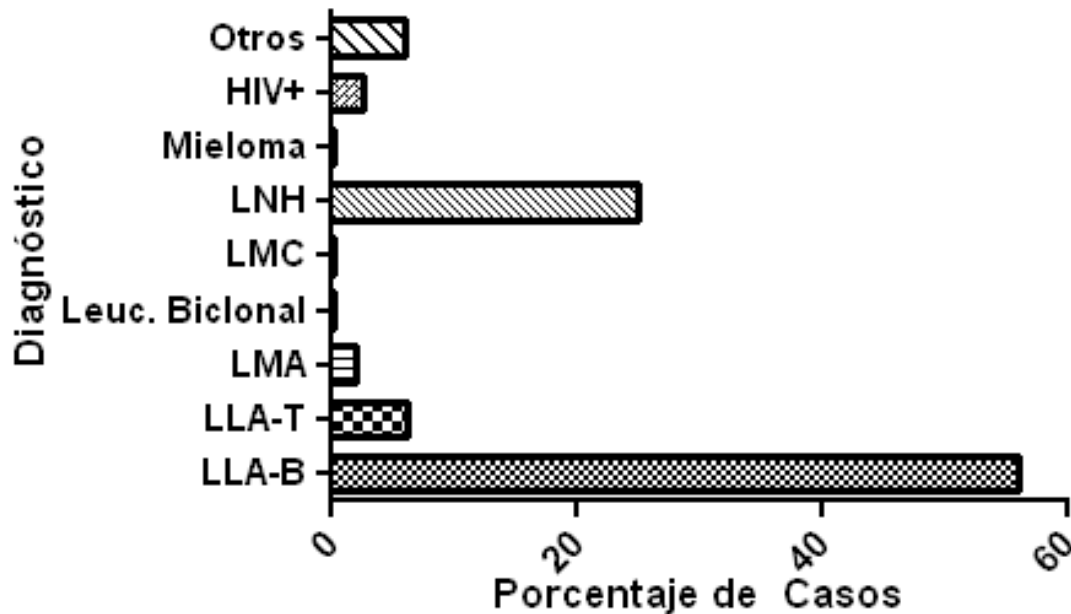
4. La mayoría de muestras especiales corresponden a LCR



5. Las muestras de líquido pleural son las de mayor volumen (0.5 ml-60 ml). El volumen de las demás muestras es <10 ml.

6. Muestras de LCR (n=932)

La mayoría de muestras de LCR se envían para la evaluación de infiltración por **LLA-B** seguidas de **LNH**



CMF detecta mínimo 0.01 células/ul

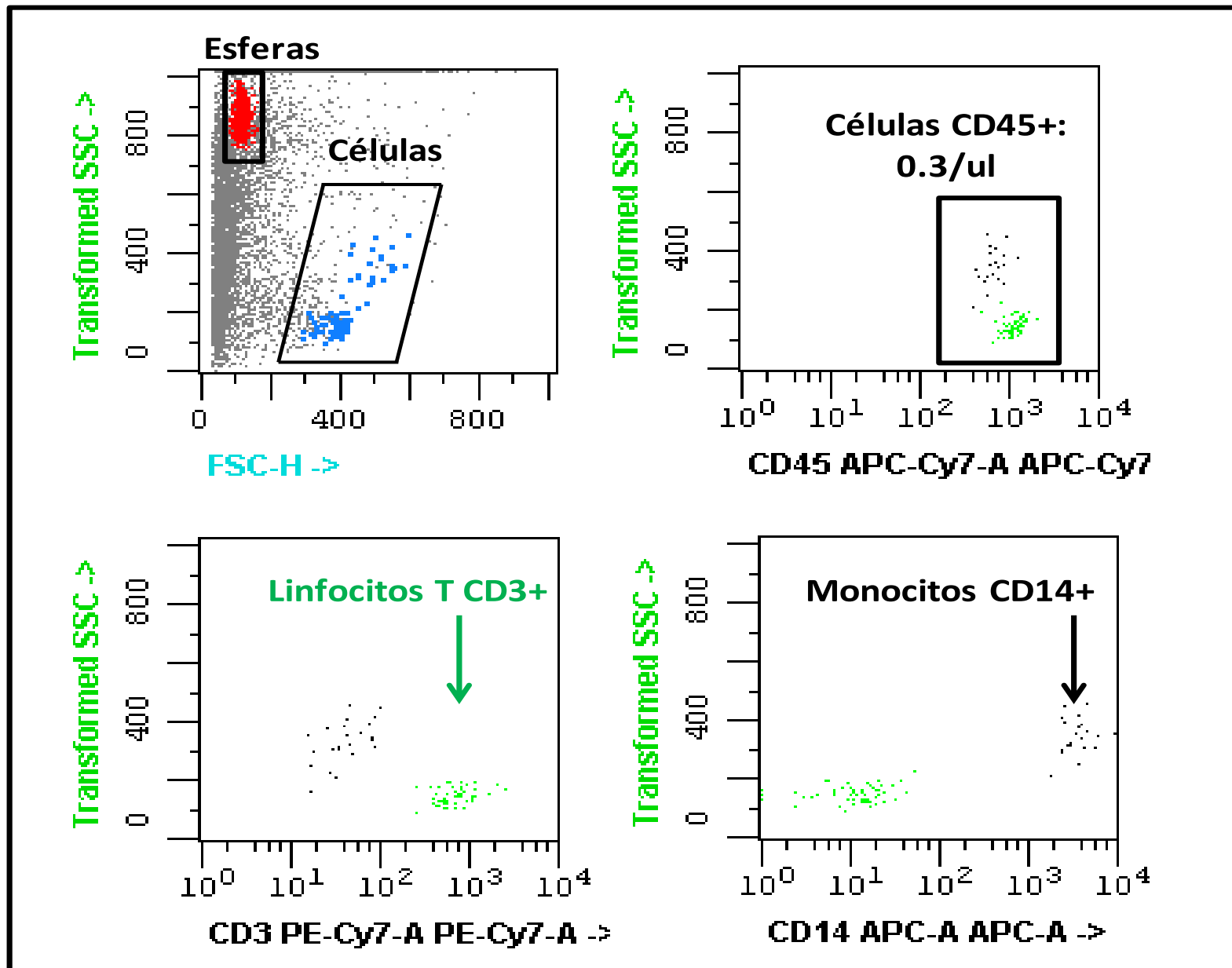
*Otros: Tumores sólidos, lesiones en pares craneales, meningoencefalitis, procesos autoinmunes, etc.

Número de células/μl en muestras de LCR

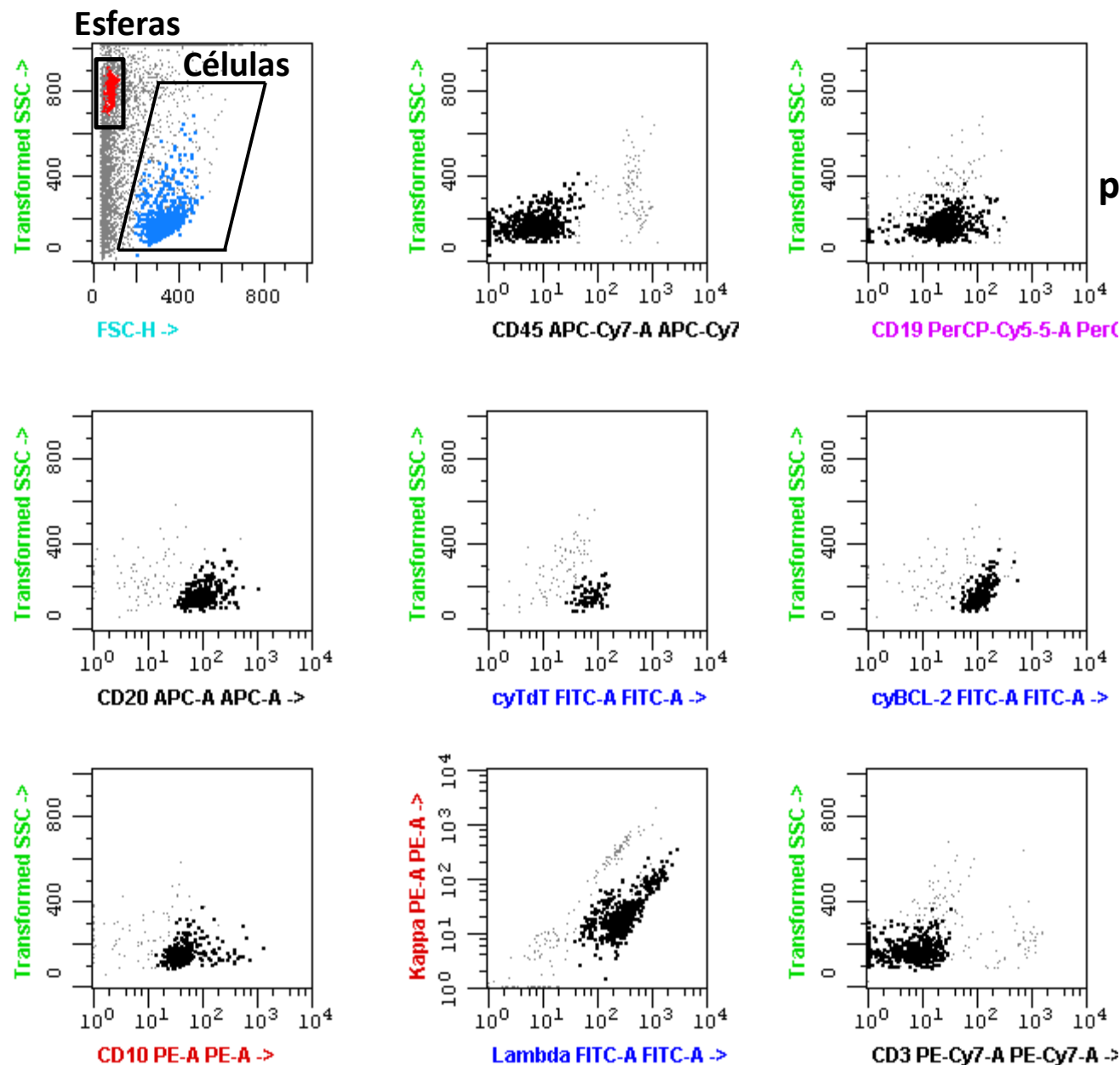
n=932	Sin Infiltración		Con infiltración	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Número de células/μl	18	0 -3022	156	0.06 – 4816
Blastos/μl	-	-	73	0.01 - 1683
Linfocitos B patológicos/μl	-	-	46	0.01 - 638
Linfocitos T patológicos/μl	-	-	0.06	-
Linfocitos T/μl*	9	0-1873	52	0.02-1940
Monocitos/μl*	4.2	0.4-100	37	0-3477
Neutrófilos/μl	32	0.02-1820	76	0.03-1277

*p<0.01

Muestra de LCR de un paciente sin Infiltración tumoral



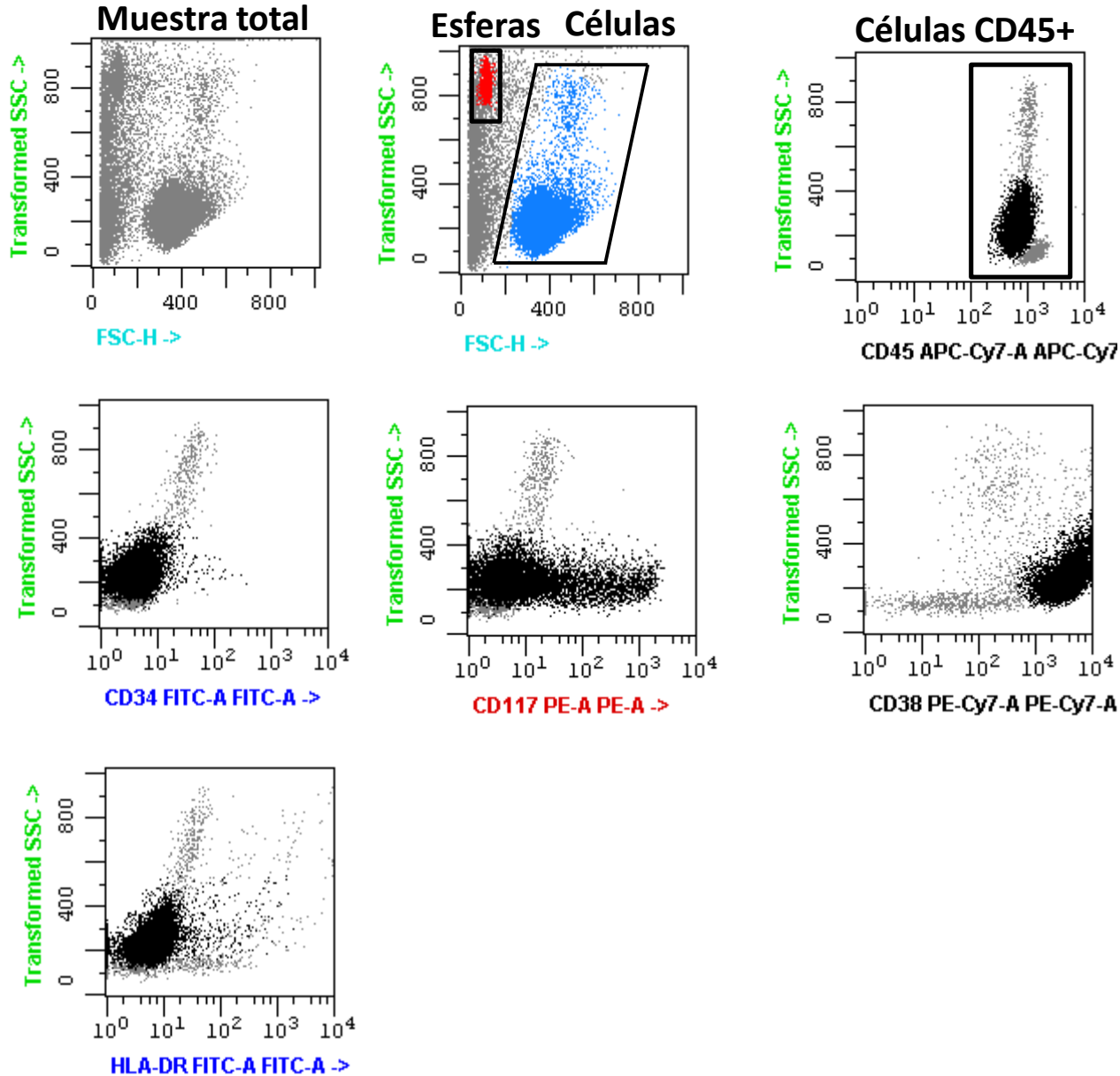
Muestra de LCR de paciente con Linfoma Linfoblástico con infiltración tumoral



**Células B
patológicas: 88.3% (5/ul)**

**CD45-
CD19+
CD20+
TdT+
Bcl-2+
CD10+
Kappa-
Lambda+
CD3-**

Muestra de LCR de paciente con Leucemia Mieloide Crónica en Crisis Blástica

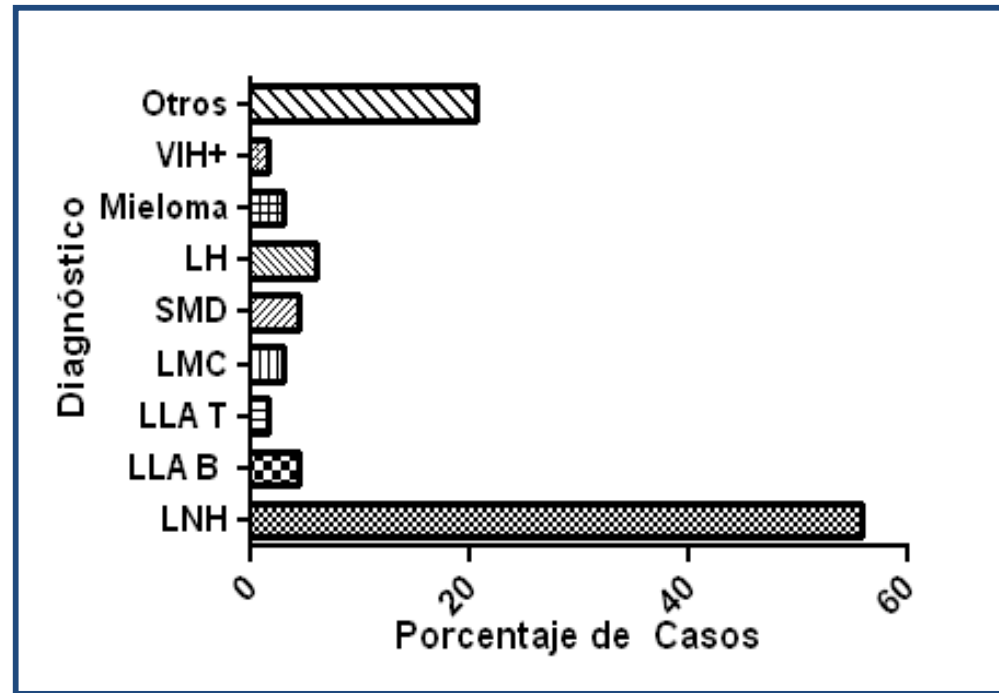


■ Blastos: 89.5% (36/uI)

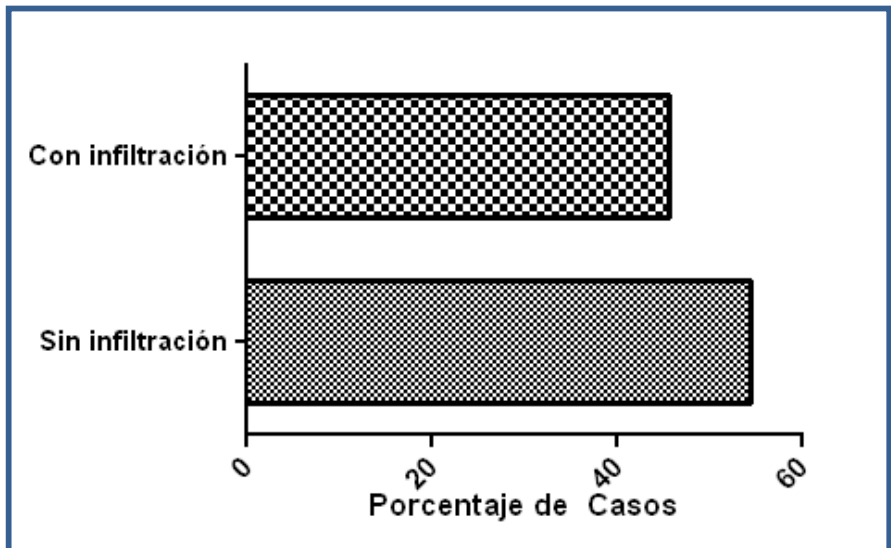
CD45+
CD34-
CD117-/±
CD38++
HLA-DR-

7. Muestras de Líquido Pleural n=95

La mayoría de muestras de LP se envían para la evaluación de infiltración por LNH



El 46% de los LP estaban infiltrados por células tumorales.

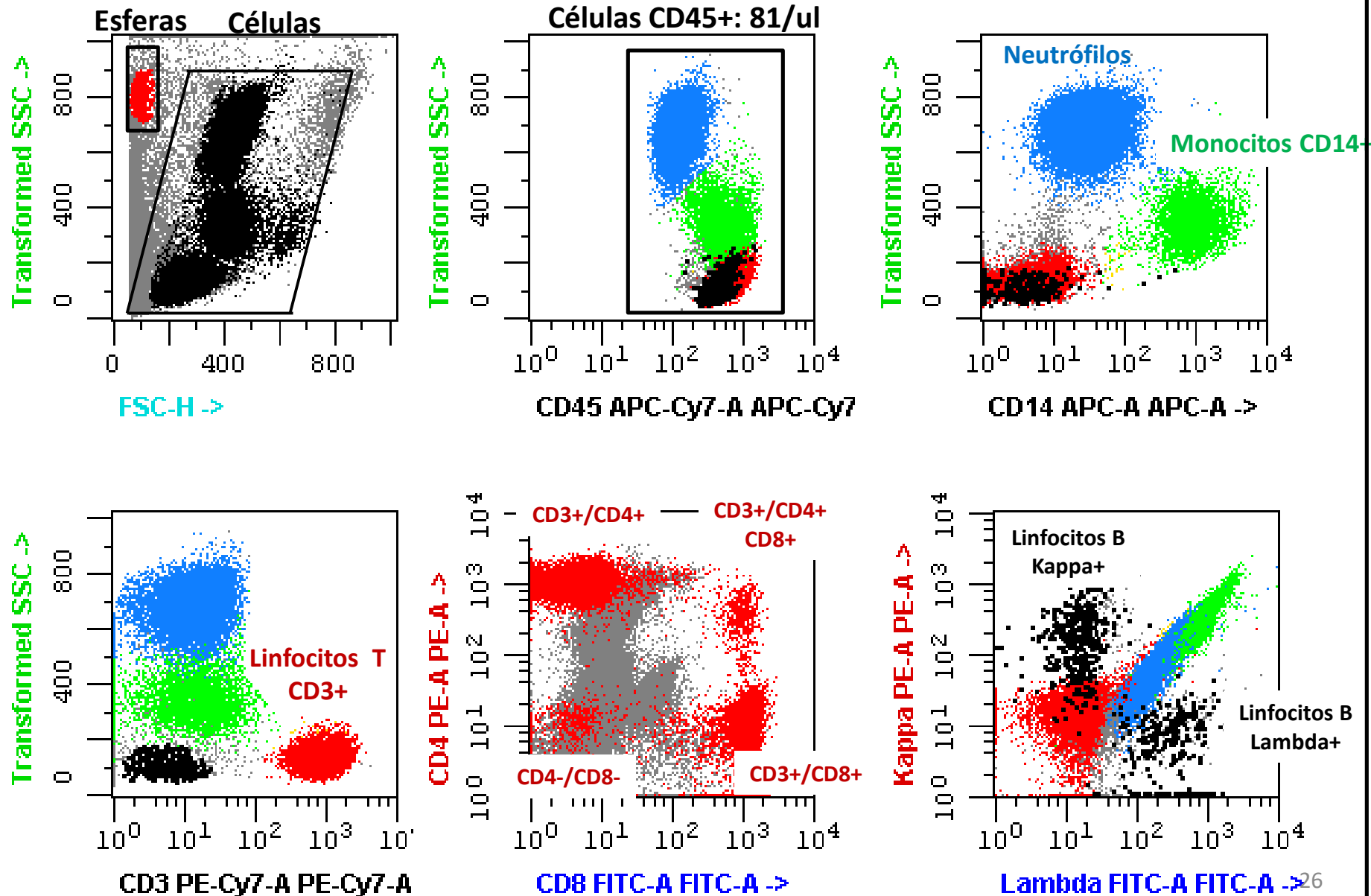


CMF detecta mínimo 0.1 células/ul

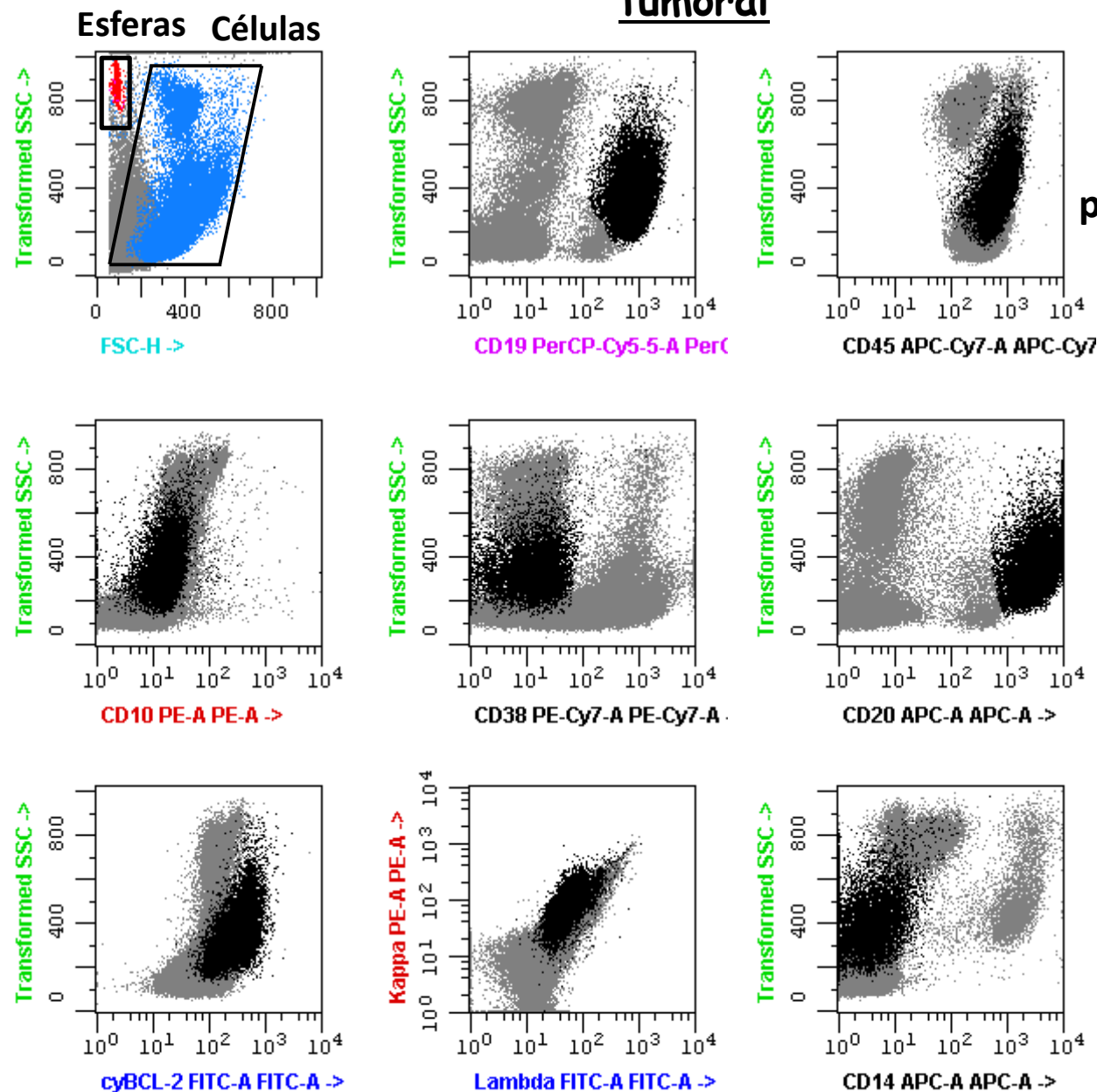
Número de células/ μ l en muestras de L. PLEURAL

n= 95	Sin Infiltración		Con infiltración	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Número de células/ μ l	862	1.2-6166	1898	12-11981
Blastos/ μ l	-	-	576.5	0.1-3214
Linfocitos B patológicos/ μ l	-	-	1085	0.2-9788
Linfocitos T patológicos/ μ l	-	-	423	423
Células plasmáticas patológicas/ μ l	-	-	1.9	0.2-5.3
Células CD45 – patológicas/ μ l	-	-	336	0.2-671
Linfocitos T/ μ l	47.9	4.5-85	32.5	3.6-83.9
Monocitos/ μ l	85	0.04-421	216	0.53-2778
Neutrófilos/ μ l	246	0.06-2179	263	0.96-2932
Linfocitos B/ μ l	103.2	0.17-793	97.7	0.15-1580
Células NK/ μ l	38	0.1-393	19.3	1.54-46.8
Células dendríticas/ μ l	29	29	2.85	2.85
Macrófagos/ μ l	83.3	0.78-352	20.5	1.36-40.9

Muestra de Líquido Pleural de paciente con sospecha de neoplasia negativo para infiltración tumoral



Muestra de Líquido Pleural de paciente con Linfoma positivo para infiltración tumoral

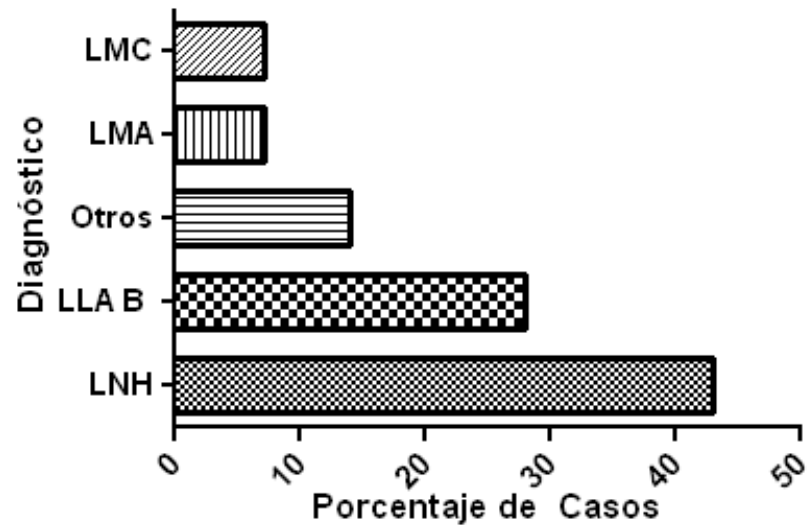


■ Células B
patológicas: 19% (94/ul)

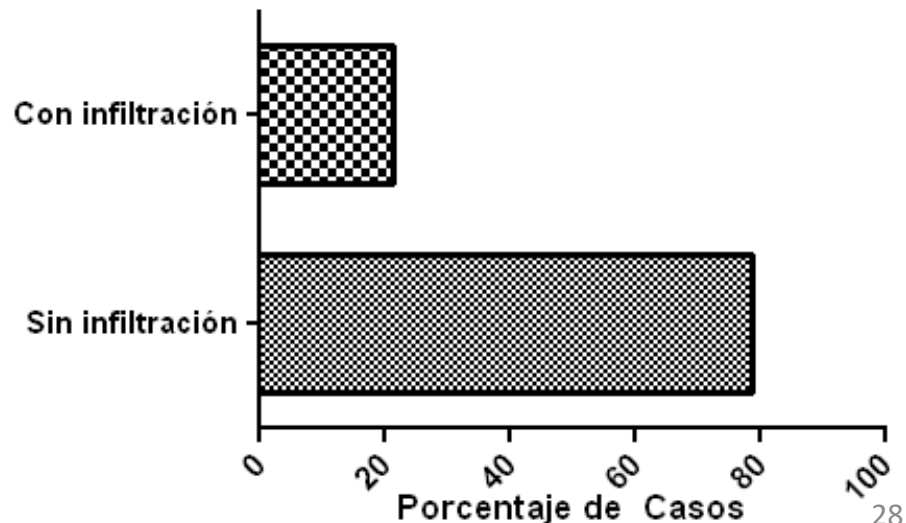
CD19+
CD45+
CD10-
CD38-
CD20+
Bcl-2+
Kappa+
Lambda-
CD14-

8. Muestras de LBA (n=24)

La mayoría de muestras de LBA se envían para la evaluación de infiltración por LNH seguidas de LLA-B



El 21.4% de los LBA estaban infiltrados por células tumorales.



**CMF detecta mínimo
0.15 células/ul**

Número de células/ μ l en muestras de LBA

n= 24	Sin Infiltración		Con infiltración	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Número de células/ μ l	1539	0.6-16087	242	7.7-603
Blastos/μl	-	-	0.23	0.23-0.23
Linfocitos B patológicos/μl	-	-	69	0.15-138
Linfocitos T/ μ l	33.8	0.08-149	121	2.3-313
Monocitos/ μ l	88.1	0.14-563	59	0.3-118
Neutrófilos/ μ l	1945	0.7-15475	11.4	4.8-18
Linfocitos B/ μ l	0.54	0.54-0.54	6	6
Células NK/ μ l	1.51	0.36-2.34	6	6
Células plasmáticas/ μ l	-	-	3.99	2.41-5.56

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La mayoría de muestras especiales procesadas y analizadas en el servicio de CMF del HUSI corresponden a **LCR** de pacientes con diagnóstico **de LLA-B**, en distintos momentos clínicos de la enfermedad.
- En este trabajo se demuestra que la CMF es una herramienta de gran **sensibilidad** en el análisis de muestras especiales debido a que puede detectar **cantidades mínimas de células tumorales** y de células normales en diversos tejidos y en un amplio rango de enfermedades.



- Los resultados del presente trabajo demuestran que la comunidad médica y los pacientes se están beneficiando con la implementación de esta herramienta para el estudio de muestras especiales en mejores **condiciones de calidad**.
- El recurso humano responsable del procesamiento técnico y del análisis de este tipo de muestras debe tener las **competencias necesarias** para garantizar la calidad de los resultados y debe promover en la comunidad médica el aseguramiento de la **calidad** en la fase pre-analítica de estas muestras.

- El uso de estabilizantes puede ser implementado en la fase pre-analítica de los diversos servicios de CMF de **todo el país** para garantizar la calidad de todos los resultados.
- Es importante **documentar** este tipo de procedimientos y resultados ya que promueven la realización de una mejor CMF en el país principalmente en grupos con menos experiencia que han emergido de forma importante en los últimos 5 años.

GRACIAS

9. OTROS LIQUIDOS CORPORALES

L. Peritoneal
N = 2

1 mx contaminada con
SP

Mieloma Múltiple

Diagnóstico

1 paciente con infiltración tumoral:
2811 células plasmáticas patológicas/ μ l.
92% infiltración



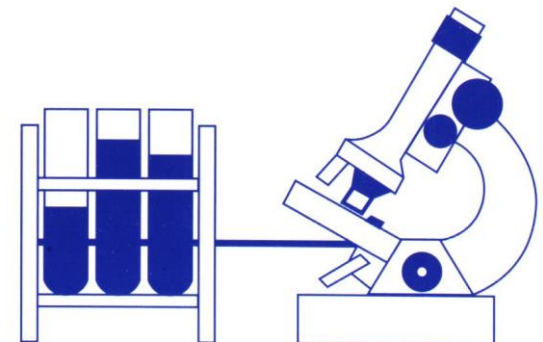
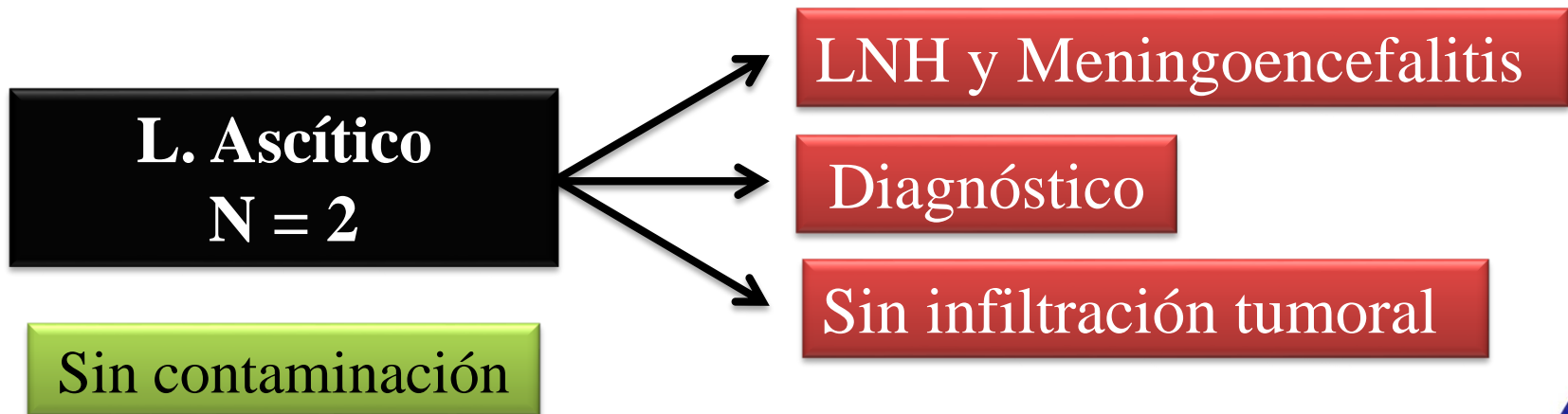
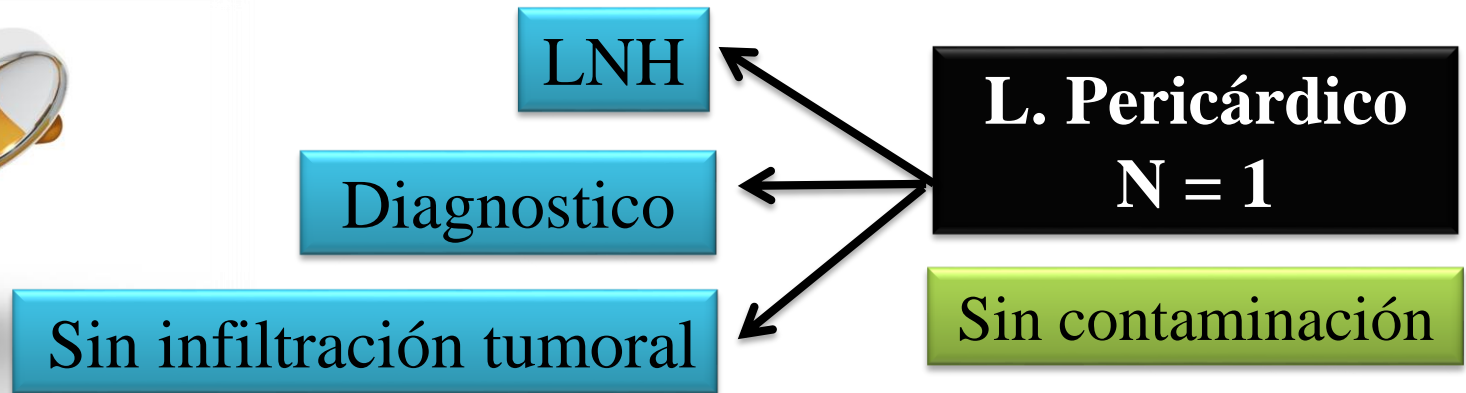
SMD

Seguimiento

2.6 blastos/ μ l - 7.6% infiltración

L. Sinovial
N = 1

Sin contaminación



10. ESTUDIO DE BIOPSIAS



Biopsia + SS (estéril)

— 6 horas máximo —

DISGREGACIÓN
MECÁNICA

BIOPSIAS GRANDES



Medimachine
BD

BIOPSIAS PEQUEÑAS



Pinzas + SS (estéril)

SUSPENSIÓN CELULAR → TRANSFIX

10. ESTUDIO DE BIOPSIAS

N = 17

- LNH (3)
- LH (2)
- LLA – B (1)
- LLA – T (1)
 - 2093 cél/ μ l
 - 88% infiltración
- Diagnóstico: 6
- Seguimiento: 1

N= 7

- LNH (1)
- Recaída
 - 2128 cél/ μ l
 - 99.4%

PULMÓN

- LNH – (1)
- Seguimiento
- Sin infiltración

TESTICULO

GANGLIO
LINFATICO

10. ESTUDIO DE BIOPSIAS

- M5 (1)
 - 211 células/ μ l
 - 21%
- Diagnostico

M. O

- LNH de Célula grande (1)
 - 5422 células/ μ l
 - 79.6%
- Rabdomiosarcoma (1)
 - 21 células/ μ l
 - 95.5%
- Diagnostico

N= 2

ABDOMINAL

- LNH (1)
 - 105 células/ μ l
 - 98.4%
- SMD (1)
 - 1.8 blastos/ μ l
 - 2.6%
- S. Hematofagocítico (1)
- Plasmocitoma (1)
- Neuroblastoma
 - 22 células tumorales/ μ l
 - 95.9%
- Diagnóstico: 4
- Seguimiento: 1

N= 5

SIN ESPECIFICAR SITIO



